



TITLE:

マンガンの解毒および排出に寄与
するタンパク質の機能解析(
Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

西藤, 有希奈

CITATION:

西藤, 有希奈. マンガンの解毒および排出に寄与するタンパク質の機能
解析. 京都大学, 2018, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21222>

RIGHT:

京都大学	博士（生命科学）	氏名	西藤 有希奈
論文題目	マンガンの解毒および排出に寄与するタンパク質の機能解析		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>マンガンは、必須微量元素元素の一つで、細胞内で様々な酵素の補因子として機能し、生体内において重要な役割を担う。一方、過剰量のマンガンは、極めて強い毒性を示し、パーキンソン病などの様々な疾患を引き起こすことが報告されている。このことから、マンガンの恒常性維持については細胞および生体レベルで厳密に制御される必要があるが、その維持機構に関する知見は主として出芽酵母を用いた解析から得られており、脊椎動物細胞においてはほとんど明らかにされていない。</p> <p>出芽酵母の解析結果などから、脊椎動物細胞においては、6種類の輸送体 Secretory Pathway Ca-ATPase 1 (SPCA1), ATP13A1, PARK9/ATP13A2, ATP13A3, Ferroportin, ZNT10/SLC30A10 がマンガンの排出および解毒に機能することが予想されている。しかしながら、各輸送体のマンガン排出および解毒への相対的な寄与や、マンガンホメオスタシスの維持における分子機構の詳細については明らかにされていなかった。本研究では、脊椎動物細胞において、これら 6 種類の輸送体のマンガン排出および解毒への寄与率を比較評価し、マンガンの恒常性維持における役割について評価した。</p> <p>ニワトリ DT40 細胞において、ゴルジ体へマンガンを輸送するとされる Spca1 を欠損させた株である Spca1^{-/-}株（以下 Δ Spca1 株）を作成し、Δ Spca1 株において高濃度のマンガン存在下での生存率が著しく低下することを確認した。本株に上記各輸送体を発現させ、高濃度のマンガンに対する生存率の回復度を指標とすることで、各輸送体のマンガン排出および解毒への寄与率について評価を行い、SPCA1 と ZNT10 が ΔSpca1 株のマンガン耐性を顕著に回復させることを明らかにした。さらに、高濃度のマンガン存在下においては、ZNT10 が SPCA1 よりも強くマンガン耐性を回復させることを明示し、脊椎動物細胞においては、ZNT10 がマンガンの排出および解毒に大きく寄与する可能性が高いことを明らかにした。また、DT40 細胞における亜鉛高感受性株 Znt1^{-/-}Mt^{-/-}Znt4^{-/-}株および上述のマンガン高感受性株 Δ Spca1 株を用いた解析により、ZNT10 が亜鉛輸送に関与せず、マンガン選択的な輸送を行う可能性を示した。この ZNT10 によるマンガン選択的輸送機構について、ZNT10 とアミノ酸配列の相同性が高く、かつ亜鉛選択的輸送を行うことが知られる ZNT1 とのドメイン置換変異体を作成し解析を行った結果、ZNT10 の膜貫通領域 (TMD) II 内において金属結合部位を形成すると考えられる 43 番目のアスパラギン残基が ZNT10 のマンガン選択的輸送において最も重要な残基であることが判明した。また、ZNT10 の TMD II に存在する 52 番目のシステイン残基と TMD V に存在する 242 番目のロイシン残基が ZNT10 の亜鉛輸送能を抑制することにより、ZNT10 のマンガン選択的な輸送を可能としていることを示した。加えて、ZNT1 の TMD II の 43 番目のヒスチジン残基を ZNT10 と同じアスパラギン残基に置換すると、ZNT1 が亜鉛輸送能を失い、マンガン輸送能を獲得することが明らかとなった。</p> <p>本研究の結果から、脊椎動物細胞の高濃度マンガンの解毒に関わるマンガンの恒常性維持において ZNT10 が重要な役割を果たすこと、さらに ZNT トランスポーターの金属基質認識は、TMD II に位置するアミノ酸残基によって制御されるという新たな知見が提示された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

マンガンは、様々な酵素の補因子として機能し、生体内において重要な役割を担う。一方で、過剰量のマンガンは極めて強い毒性を示し、様々な疾患を引き起こす。したがって、マンガンの恒常性維持には細胞・生体レベルでの厳密な制御が必要であるが、その維持機構に関する知見は主に出芽酵母を用いた解析から得られたものであり、脊椎動物細胞においてはほとんど明らかにされていない。6種類の輸送体 Secretory Pathway Ca-ATPase 1 (SPCA1), ATP13A1, PARK9/ATP13A2, ATP13A3, Ferroportin, ZNT10/SLC30A10 がマンガンの排出および解毒に機能することが予想されていたが、各輸送体のマンガン排出および解毒への相対的な寄与や、マンガンの恒常性維持における分子機構の詳細については不明であった。本研究は、これら6種類の輸送体のマンガン排出および解毒への相対的な寄与を比較評価し、脊椎動物細胞におけるマンガンホメオスタシス維持機構について解析したものであり、以下のような知見を得ている。

- 1) ニワトリ DT40細胞において、ゴルジ体へマンガンを送るとされる *Spcal* を欠損させた株 (*Spcal*^{-/-}株) をマンガン感受性株として樹立した。本株に上記各輸送体を発現させてそれぞれのマンガン排出および解毒への寄与率を評価し、SPCA1とZNT10が顕著にマンガン耐性を回復させること、また、ZNT10がSPCA1よりも強くマンガン耐性を回復させることを明示し、脊椎動物細胞においては、ZNT10がマンガンの排出および解毒に大きく寄与する可能性が高いことを明らかにした。
- 2) DT40細胞における亜鉛高感受性株 *Znt1*^{-/-}*Mt*^{-/-}*Znt4*^{-/-}株およびマンガン高感受性株 Δ *Spcal*株を用いた解析により、ZNT10が亜鉛輸送に関与せず、マンガン選択的な輸送を行う可能性を示した。
- 3) 亜鉛選択的輸送を行うZNT1とのドメイン置換変異体を作成して解析を行い、ZNT10の膜貫通領域 (TMD) II 内において金属結合部位を形成すると考えられる43番目のアスパラギン残基がZNT10のマンガン選択的輸送において最も重要な残基であることを明らかにした。また、ZNT10のTMD IIに存在する52番目のシステイン残基とTMD Vに存在する242番目のロイシン残基がZNT10で見られる亜鉛輸送能の消失と、ZNT10のマンガン選択的な輸送を可能としていることを示した。
- 4) ZNT1のTMD IIの43番目のヒスチジン残基をZNT10と同じアスパラギン残基に置換すると、ZNT1が亜鉛輸送能を失い、マンガン輸送能を獲得することを明示した。

以上のように、本研究は、脊椎動物細胞のマンガンの恒常性維持におけるZNT10の役割、さらにそのマンガン特異的輸送の分子機構について示した成果として、生化学分野に大きく貢献するものである。また、記載内容から、申請者は生命科学に関する高度で幅広い知識、専攻分野における優れた研究能力を有し、生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見と概念を提示していると判断できる。また、本論文は、論理的かつ一貫性をもって記述されていた。よって、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。

また、平成30年1月16日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、申請者を合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日